

AZ OTKA T 042721 PROGRAM ZÁRÓJELENTÉSE

A program a táplálék- és folyadékfelvétel, a testsúly és az anyagcsere egymással szorosan összefüggő előagyi szabályozásában alapvető idegi és neurokémiai mechanizmusok eddigieknél részletesebb feltárására, s így jobb megértésére irányult. E többértű célok megvalósítására komplex, integratív szemléletű és metodikájú mikroelektrofiziológiai, neurokémiai-biokémiai és magatartási vizsgálatokat folytattunk laboratóriumi patkányokban és rhesus majomban.

Kutatásaink tengelyében, a korábbiakhoz hasonlóan, a táplálkozás és az energiaforgalom központi szabályozásában feltételezetten kiemelkedő jelentőségű előagyi glukóz-monitorozó (GM) idegsejt-hálózat sokrétű, differenciált jellemzése állt.

A vizsgálatsorozat hangsúlyos eleme volt a kemoszensoros neuronok azonosítása és topográfiájuk meghatározása különböző előagyi területeken. A multibarrel mikroelektroforetikus technika használatával fontos szabályozó vegyületek (neurotranszmitterek, modulátorok, stb.) GM idegsejtekre gyakorolt hatását, szorosan kapcsolódó agyi mikroinjekciós kísérleteinkben pedig e neuronok homeosztázis fenntartásában betöltött nélkülözhetetlen szerepét mutattuk ki. Külön teret szenteltünk azoknak a vizsgálatoknak, amelyekben a GM idegsejteknek a táplálék- és folyadékfelvételt legközvetlenebbül befolyásoló kémiai ingermodalitás, az ízlelés előagyi információ feldolgozási folyamataiban való érintettségére vonatkozóan nyertünk adatokat.

Az éber rhesus majomban a program kései szakaszában újraindított kísérleteink jelentősége (többek között) abban áll, hogy emberhez igen közeli filogenetikai rokonságban álló főemlős fajban szereztünk a humán táplálkozás és anyagcsere szabályozás előagyi neuronális működéseire is vonatkoztatható, alapvetően új ismereteket.

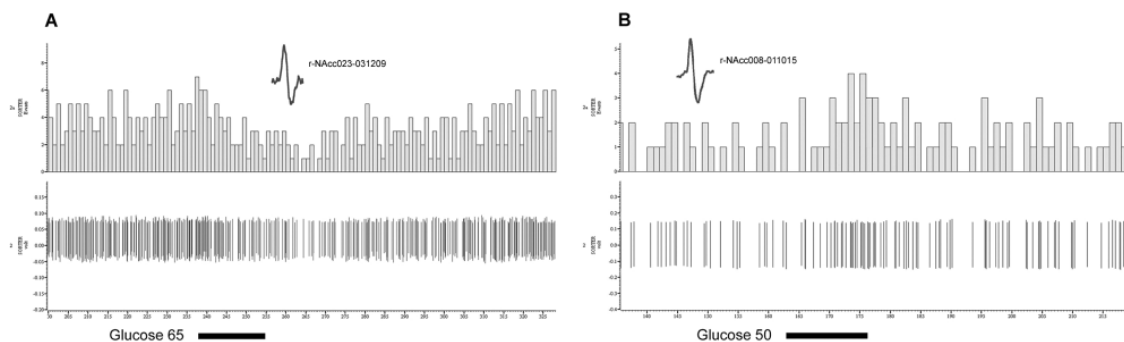
A kutatások főbb eredményei

I. Specifikus kemoszensoros (GM) idegsejtek azonosítása az előagyban

Összességében közel 500 neuron extracelluláris egysejttevékenységét vezettük el a laboratóriumi patkány és rhesus majom előagyban: a ventromediális hypothalamusz mag (VMH) mellett elsősorban a nukleusz akkumbenszben (NAcc), a globusz palliduszban (GP), a mediodorzális prefrontális kéregben (mdPFC), valamint a ventrolaterális prefrontális (orbitofrontális) kéregben (OBF). A kemoszensoros idegsejtek hypothalamikus azonosítása megerősített korábbi adatokat (*cf. Oomura, 1980*), a szakirodalomban ugyanakkor elsőként számoltunk be GM neuronok jelenlétéről (korábban a GP-ben /kb. 15%/, majd) a NAcc-ben, a mdPFC-ben és az OBF-ben is. A prefrontális kéreg két vizsgált területén az összes idegsejt mintegy 8-12%-a csökkentette vagy növelte tüzelési frekvenciáját D-glukóz mikroelektroforetikus adásakor. A kemoszensoros unitok e kérgi struktúrákban homogén, a többi, glukózra

válaszkészséget nem mutató, ún. glukóz-inszenzitív (GIS) sejtekkel keveredő megoszlást mutattak.

Ilyen gátló választ adó, ún. glukóz-érzékeny (GS) ill. serkentődő, ún. glukóz-receptor típusú (GR) neuronokat nagy számban találtunk mind a rágcsló, mind a főemlős akkumbenszben. Az ehelyütt elvezetett idegsejtek mintegy negyede válaszolt a glukóz extracelluláris szintjének növekedésére, és a GM neuronok két típusának megoszlása jellemző regionális eltérést mutatott a struktúrán belül: a 'shell' szubdivízióban a kemoszenzoros unitok $\frac{3}{4}$ -e GS, míg a 'core' területén 80%-uk GR sejt volt. A NAcc-ben található kétféle kemoszenzoros neurontípus jellemző példáját szemlélteti az 1. ábra.



1. ábra. D-glukóz kiváltotta egysejttevékenység változások patkány nukleusz akkumbenszben. A: 'shell' régió, GS neuron, gátló válasz; B: 'core' szubdivízió, GR idegsejt, facilitáció. Inzertek: extracelluláris akciós potenciálok. Vastag vízszintes vonal: a mikroelektroretikus anyagbeadás időtartama; mellette lévő számok: az ejekciós áram nagysága nanoamperben. Abszcissa: idő (s); ordináta: feszültség (mV) és tüzelési frekvencia (spike/s).

II. Az előagyi idegsejtek neurokémiai modulációja

1. Neurotranszmitterekkel szembeni érzékenység

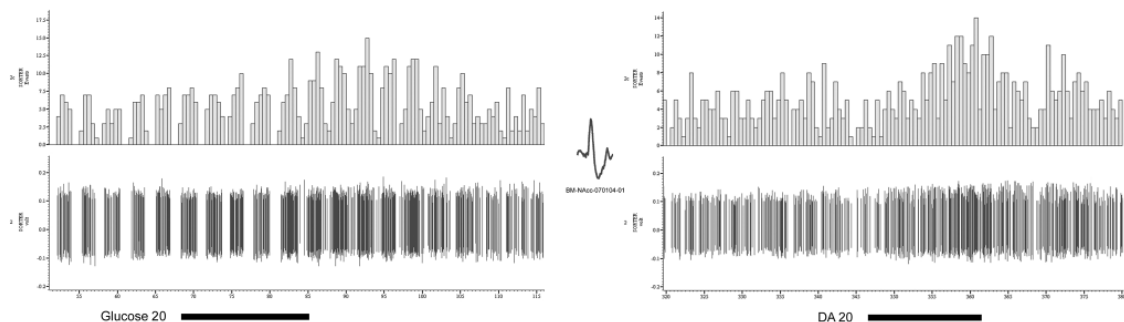
Az előagyi GM neuronok differenciált válaszkészségére derült fény különböző neurotranszmitterek (dopamin /DA/, noradrenalin /NA/, gamma-amino-vajsav /GABA/, acetilkolin /Ach/) mikroiontoforetikus adásakor. (E technika alkalmazásakor az elektróda hegy éppen tanulmányozott idegsejthez való megfelelő közelségének bizonyítására a glutamát kiváltotta gyors serkentődést használjuk, tehát a további vizsgálatokra a unitok ezen excitátoros aminosavra adott válaszainak regisztrálását követően került sor.)

A NA és az Ach mikroiontoforetikus adása számos neuron működését megváltoztatta a tanulmányozott agyterületeken (10-25%-os válaszgyakoriság). A NA esetében legfőképpen inhibitoros, az Ach-éban döntően excitációs aktivitás változásokat vezettünk el. A GM és a GIS unitok e neurotranszmitterekre való érzékenysége lényegesen nem különbözött egymástól.

Az elvezetési helyül választott limbikus struktúrák mindegyike a mezolimbikus-mezokortikális dopaminergiás rendszer projekciós területként ismert (*Björklund és mtsai, 1978; cf. Pierce és Kumaresan, 2006*), ezért különös hangsúlyt fektettünk az itt

található kemoszenzoros idegsejtek e katecholaminnal szembeni érzékenységének tanulmányozására.

A NAcc-ben a GM neuronok több, mint kétharmada változtatta meg működését DA mikroiontoforetikus adásakor. A 'shell' és a 'core' régióban a DA a vizsgált sejtek többségében (90%-ában ill. 60%-ában) gátló, míg a mdPFC-ben a unitok majdnem kétharmadában serkentő hatásúnak bizonyult. Az OBF neuronokban a hatásirányok megoszlása kiegyenlített volt. Mindhárom limbikus struktúrában a kemoszenzoros idegsejtek a GIS unitoknál nagyobb DA-érzékenységet mutattak. A 2. ábra egy főemlős NAcc-ben elvezetett GM sejt e katecholamin kiváltotta válaszát demonstrálja.



2. ábra Kemoszenzoros (GR) neuron tüzelési változásai rhesus majom akkumbenszben. Bal oldal: D-glukóz mikroelektroforetikus adására bekövetkező facilitáció. Jobb oldal: DA kiváltotta aktivitás növekedés. (Az értelmezést segítő egyéb leírások megegyeznek az előző ábráéval.)

A DA mellett a GABA is a limbikus körkapcsolatok (és a lokális neuronális információ továbbítás) egyik fő neurotranszmittere (*cf. Kelley és mtsai, 2005*). A GABA kiváltotta egysejttevékenység változások tekintetében a NAcc-ben érdekes regionális eltéréseket figyeltünk meg. Összességében az akkumbensz neuronok több, mint fele gátlódott GABA mikroiontoforetikus adásakor, ugyanakkor ez az arány a 'core' régióban a vizsgált sejtek ¾-ét, míg a 'shell' szubdivízióban csak alig több, mint egyharmadát tette ki. A területi elkülönülés fennáll a kemoszenzoros unitok vonatkozásában is: a 'core'-ban egyetlen GS neuron sem válaszolt GABA-ra, a 'shell'-ben viszont e neurotranszmitter mindegyik GR idegsejtet gátolta.

2. Modulátorokkal, egyéb anyagokkal szembeni érzékenység

Az előagyi sejtek neurokémiai jellemzésére három, a homeosztázis fenntartásában érintett (interleukin 1 β /IL-1/) vagy az egyensúlyt éppenhogy veszélyeztető (metil-glyoxál /MGO/, streptozotocin /STZ/) anyag egysejttevékenységre gyakorolt hatását tanulmányoztuk.

A MGO a metabolikus betegségek (diabetes mellitus /DM/ bizonyos formái, metabolikus szindróma /MSz/) hátterében - legalább részben - kóroki jelentőségűnek feltételezett karbonilstressz-mechanizmusok jellemző terméke (*Phillips és mtsai, 1993*). MGO - az irodalomban előzmény nélküli - mikroelektroforetikus adásakor a VMH GR

neuronjai specifikusan megváltoztatták működésüket, míg ugyanitt a GIS idegsejtek ugyanezen kémiai ingerre egyáltalán nem válaszoltak.

A STZ a hasnyálmirigy inzulin termelő β -sejtjeit specifikusan elpusztítja, s mint ilyen a primér inzulinómák oki kezelésében használatos. Ugyanezen tulajdonsága okán mára elterjedten alkalmazzák az 1-es típusú DM állatkísérletes modelljének létrehozására (*Like és Rossini, 1976*). Mikroelektroforetikus adásával mindeztideig senki sem próbálkozott még. Saját ezirányú kísérleteink nyomán bebizonyosodott, hogy a STZ a vizsgált agyterületek (VMH, NAcc, mdPFC, OBF) mindegyikén specifikusan csak a GM idegsejtek aktivitását változtatja meg, sőt, a szer többször ismételt alkalmazása e kemoszenzoros neuronok pusztulását idézi elő.

A multifunkcionális primér cytokin IL-1-ről ma már ismert, hogy számos homeosztatikus szabályozó működésben érintett (*cf. Plata-Salaman, 1991*). Extrapiramidális és hypothalamuszon kívüli limbikus rendszeri közvetlen neuronális hatásait ezideig nem vizsgálták még.

Mindenképpen figyelemre méltó tehát az a megfigyelésünk, mely szerint a primér cytokin IL-1 a NAcc idegsejtjei közel egyharmadának működését módosítja, s a hatásos unitok több, mint 80%-ban a kemoszenzoros neuronok voltak.

A GP idegsejtjeihez mikroelektroforetikus juttatott IL-1 az esetek több, mint 40%-ában okozott működésváltozást. A jellemző hatás elhúzódó, de reverzibilis gátlás volt.

Adataink tanúsága szerint a GP-ben a kemoszenzoros neuronok 91%-a érzékeny e primér cytokinre, míg a GIS unitok alig 30%-a mutat válaszkésztséget.

Az OBF-ben az IL-1 az idegsejtek 56%-ának működését változtatta meg. A cytokin kiváltotta hatás az esetek mintegy kétharmadában facilitáció volt. Az IL-1 érzékeny neuronok 89%-a GM unitnak bizonyult, s a GR és GS sejtek cytokin válaszkésztségében nem mutatkozott szignifikáns eltérés.

3. Intracerebrális mikroinjekciók hatása

A fentiekben említett anyagok (MGO, STZ, IL-1) előagyi kemoszenzoros neuronokra gyakorolt hatásának homeosztatikus jelentőségét támasztják alá kapcsolódó agyi mikroinjekciós kísérleteink leletei is.

A VMH-ba juttatott MGO hatására kórosan fokozott indukált táplálékfelvétel észlelhető, krónikusan megmaradó csökkent glukóz-tolerancia alakul ki, dyslipidémia, hyperurikémia tapasztalható, s inzulinrezisztencia mellett emelkedett plazma leptinszint mérhető.

Az egysejttevékenység vizsgálatok tanúsága szerint a GM neuronokra specifikusan toxikus STZ a VMH-ba, az OBF-be, s a NAcc-be adva is hasonló, a 2-es típusú DM és a MSz tüneteire emlékeztető, súlyos táplálkozási és metabolikus zavarokat hoz létre. Ezen állatokban jellemzően: *i*) fiziológias kihívásokra kórosan megnövekedett táplálékfelvétel; *ii*) glukóz-intolerancia; és *iii*) számos metabolit és hormon (koleszterin, trigliceridek, húgysav, inzulin, leptin) plazmaszintjének patológiás emelkedése tapasztalható. E vizsgálatok a VMH-ban azt is igazolták, hogy az STZ adás kedvezőtlen hatásai nem-toxikus szerves króm-vegyület előkezeléssel kivédhetők.

A primér cytokin IL-1 pallidális és orbitofrontális kérgi mikroinjekciójának következményei - a rövid távú táplálékfelvétel csökkenése, a testhőmérséklet

emelkedése, glukóz-intolerancia kialakulása, plazma metabolit és hormon koncentráció változások - a fentiekhez ugyancsak nagymértékben hasonlóknak bizonyultak.

III. Előagyi íz-információ feldolgozás – kemoszenzoros idegsejtek

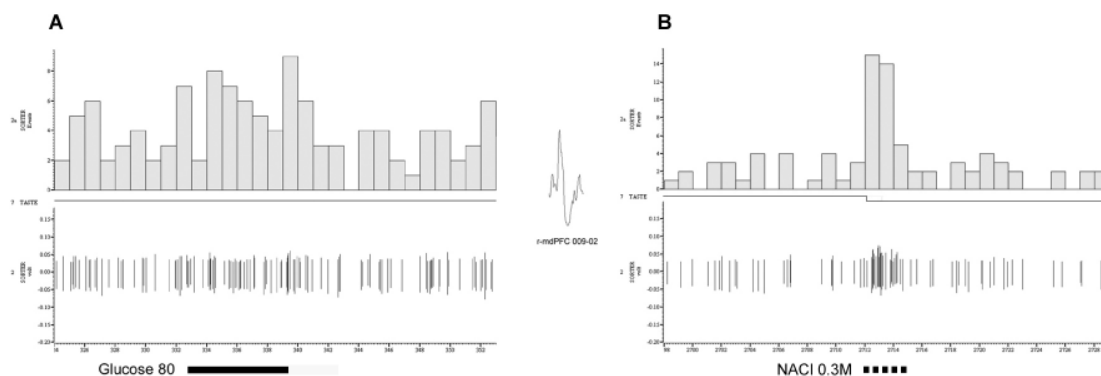
Kollaborációban folytatott speciális magatartási-elektrofiziológiai patkánykísérletekben megállapítottuk, hogy a GM neuronokat nagyszámban tartalmazó centrális amygdala-mag, az elsődleges agykérgi (frontoparietális) íz-feldolgozó área, illetve az OBF elektromos ingerlése differenciált módon hat a parabrachiális mag neuronjainak kondicionált íz-averziós tanulással összefüggő válaszkészségére.

Korábbi eredményeink alapján további, e téren folytatott vizsgálatainkban az előagyi idegsejtek összetett, 'belső' (neurokémiai) és 'külső' (ízekre való) kémiai modulációjára derítettünk fényt.

1. Komplex, 'endogén' és 'exogén' neuronális kémiai érzékenység

Az általunk a jelen programban vizsgált agyterületeken az idegsejtek egy része a mikroelektroforetikus anyagbeadásokra való működésváltozások mellett intraorális íz-ingerlésre is válaszkészséget mutatott.

A NAcc-ben a neuronok mintegy 60%-a, míg a mdPFC-ban 40%-uk változtatta meg tüzelés frekvenciáját egy-vagy több íz-ingerre. Ez utóbbi, kérgi struktúrában a GM unitok egyharmadának íz-érzékenységét bizonyítottuk, ugyanez az arány a NAcc-ben több, mint 80%-nak adódott. A 3. ábra egy mdPFC-beli GM sejt íz-válaszát szemlélteti.



3. ábra Komplex, 'endogén' és 'exogén' neuronális kémiai érzékenység patkány mdPFC-ben. A: GR sejt, facilitáció D-glukóz mikroelektroforetikus adásakor. B: ugyanezen neuron sós íz kiváltotta excitációs válasza. Szaggatott vonal: az intraorális íz-ingerlés időtartama. (Egyéb magyarázatokat ld. az előző ábrák szövegében.)

Mindkét limbikus előagyi területen DA mikroiontoforetikus adása hatékonyan befolyásolta az íz-válaszkészséget mutató idegsejtek felének, a kemoszenzoros íz-sejtek majdnem háromnegyedének aktivitását. Adataink szerint D1 (SCH 23390) ill. D2

blokkoló (szulpirid) mikroelektroforézisével számos kemoszenzoros neuron íz-válasza felfüggeszthető.

2. Előagyi mikroinjekciók íz-percepciók hatása

A GM neuronokat specifikusan károsító, elpusztító STZ VMH-ba, NAcc-be vagy OBF-be juttatása nyomán jellemző íz-percepciók zavarok is kialakulnak. A mikroinjekciók mindhárom limbikus struktúrában íz-reaktivitási deficitet eredményeznek: az e módon kezelt állatok a kellemes ízeket (pl. nádcukor) inkább averzívnek, míg a kellemetleneket (pl. kinin hidroklorid) elfogadhatónak érzik. A NAcc-be adott toxin emellett kondicionált íz-averziós tanulási zavart hoz létre.

Hasonló, de enyhébb íz-percepciók zavarok létrejöttét igazoltuk a fenti agyterületek IL-1 mikroinjekcióját követően.

A vizsgálatok haszna

A programban feltárt adatok segítségével a homeosztázis, a táplálkozás és anyagcsere központi szabályozása, s így a kapcsolódó megbetegedések eddigieknél teljesebb megértését segítjük elő. E kutatások további kiterjesztésével, a homeosztatisz élettani működések központi idegrendszeri regulációjában érintett sejtszintű hatások in vivo körülmények közötti, integratív szemléletű, részben az emberhez közel álló rhesus majomban folyó vizsgálatával az eddigieknél szélesebb körű, sokrétűbb ismeretek birtokába jutunk, melynek révén táplálkozási és metabolikus betegségek terápiáját célzó gyógyszer-csoportok feltárásához kerülhetünk közelebb.

A zárójelentésben említett irodalmi hivatkozások

1. Oomura, Y.: Input-output organization in the hypothalamus relating to food intake behavior. In: Morgane, P.J., Panksepp, J. eds. Handbook of the Hypothalamus. Physiology of the Hypothalamus Vol. 2. New York, Marcel Dekker Inc. 557-620, 1980.
2. Björklund, A., Divac, I., Lindvall, O.: Regional distribution of catecholamines in monkey cerebral cortex, evidence for a dopaminergic innervation of the primate prefrontal cortex. Neurosci. Lett. 7: 115-119, 1978.
3. Pierce, R. C., Kumaresan, V.: The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 30: 215-238, 2006.
4. Kelley, A. E., Baldo, B. A., Pratt W. E. Will, M. J.: Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. Physiology & Behavior. 86: 773-795, 2005.
5. Philips, S. A., Mirlees, D., Thornalley, P. J.: Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. Effect of the aldose reductase inhibitor statil. Biochem Pharmacol. 46: 805-811, 1993.

6. Like, A. A., Rossini, A. A.: Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science*. 193: 415-417, 1976.
7. Plata-Salaman, C. R.: Immunoregulators in the nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 15(2): 185-215, 1991.

A zárójelentéshez csatlakozó főbb saját irodalom

Folyóiratcikk:

1. Karádi, Z., Lukáts, B., Degrell, P., Molnár, G., Nagy, J. and Wittmann, I.: Metabolikus és táplálkozási zavarok a ventromedialis hypothalamusba juttatott metilglioxál-mikroinjekció után laboratóriumi patkányban. *Diabetologia Hungarica*, XI.(3): 177-188, 2003.
2. Tokita, K., Zoltán Karádi, Tsuyoshi Shimura and Takashi Yamamoto: Centrifugal inputs modulate taste aversion learning associated parabrachial neuronal activities. *J Neurophysiol.*, 92: 265-279, 2004. **IF: 3.592**
3. Keszthelyi, Zs., T. Past, B. Lukáts, K. Koltai and Z. Karádi: The central effect of chromium on glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry*, 37: 242-242, 2004. **IF: 2.089**
4. Karádi, Z., B. Lukáts, Sz. Papp, Cs. Szalay, R. Egyed, L. Lénárd, and G. Takács: Involvement of forebrain glucose-monitoring neurons in taste information processing: Electrophysiological and behavioral studies. *Chemical Senses*, 30:168-169, 2005. **IF: 2.594**
5. Karádi, Z., R. Egyed, B. Lukáts and L. Lénárd: Homeostatic alterations after intrapallidal microinjection of interleukin-1 β in the rat. *Appetite* 44(2): 171-180, 2005. **IF: 1.431**
6. Lukáts B., R. Egyed, L. Lénárd and Z. Karádi: Homeostatic alterations induced by interleukin -1 β microinjection into the orbitofrontal cortex in the rat. *Appetite* 45(2): 137-147, 2005. **IF: 1.431**
7. Lukáts B., R. Egyed and Z. Karádi: Single neuron activity changes to interleukin 1 β in the orbitofrontal cortex of the rat. *Brain Res.* 1038(2): 243-246, 2005. **IF: 2.389**
8. Papp Sz., B. Lukáts, G. Takács, Cs. Szalay, Z. Karádi: Glucose-monitoring neurons in the nucleus accumbens. *NeuroReport* , 2007. (submitted) **IF: 1.995**

Könyvrészlet:

9. Karádi, Z., B. Lukáts, Sz. Papp, G. Takács, R. Egyed, and L. Lénárd: The central glucose-monitoring neural network: major protector of the adaptive homeostatic balance for well being of the organism. In: *Brain-Inspired IT I*, (Eds. H. Nakagawa, K. Ishii and H. Miyamoto), International Congress Series Vol. 1269, Elsevier, Amsterdam, pp.30-33, 2004.
10. Lukáts, B., R. Egyed, Sz. Papp, G. Takács, Cs. Szalay, L. Lénárd and Z. Karádi: Involvement of the Orbitofrontal Cortical IL-1 β Mechanisms in the Central Homeostatic Control. In: *Brain-Inspired IT II*, (Eds. K. Ishii, K. Natsume & A.

- Hanazawa), International Congress Series Vol. 1291, Elsevier, Amsterdam, pp. 137-140, 2006.
11. Lukáts, B., T. Inoue, M. Mizuno, Sz. Papp, G. Takács, Cs. Szalay, R. Egyed, L. Lénárd, Y. Oomura, Z. Karádi and S. Aou: Electrophysiological and Behavioral Evidences of the Feeding-related Neuronal Processes in the Orbitofrontal Cortex. In: Brain-Inspired IT III, (Eds. K. Ishii, K. Natsume & A. Hanazawa), International Congress Series 1301, Elsevier, Amsterdam, pp. -, 2007. (in press)